

Manuálna príručka protokolu čistenia na použitie s

prepIT™•L2P

DNagenotek™

www.dnagenotek.com

Tel.: +1 613 723.5757
support@dnagenotek.com
sales@dnagenotek.com

3000 - 500 Palladium Drive
Ottawa, ON, Canada K2V 1C2

*Vynikajúce vzorky
Osvedčený výkon*



Obsah

Zamýšľané použitie/účel	4
Stabilita pri používaní	4
Funkcie	4
Materiály	4
Varovania a bezpečnostné opatrenia	4
Obmedzenia používania produktu.....	5
Preprava produktu prepIT•L2P	5
Skladovanie produktu prepIT•L2P (doba skladovania)	5
Likvidácia	5
Údržba/opravy	5
Zhrnutie výkonnostných charakteristík	5
Balenie produktu	5
Záruky.....	6
Riešenie problémov	6
Laboratórny protokol k produktu prepIT•L2P na manuálnu purifikáciu DNA z:	
500 µl vzorky.....	7
Celej vzorky.....	11
Kvantifikácia DNA	18

Protokol k produktu prepIT™-L2P je k dispozícii v ďalších jazykoch na www.dnagenotek.com

Technická podpora je k dispozícii od pondelka do piatku (od 9:00 do 17:00 ET):

- Bezplatná linka (Severná Amerika): 1.866.813.6354, klapka 6
- Všetky ostatné krajiny: +1.613.723.5757, klapka 6
- E-mail: support@dnagenotek.com

■ DNA Genotek Inc.
3000 - 500 Palladium Drive
Ottawa, ON, Canada K2V 1C2
E-mail: support@dnagenotek.com

Zodpovedná osoba v Spojenom kráľovstve: Emergo Consulting (UK) Limited c/o Cr360 - UL International, Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

 Novosanis NV, Bijkhoevelaan 32c,
2110 Wijnegem, Belgicko
E-mail: EUAR@novosanis.com

 Arazy Group Swiss GmbH
Bruderholzallee 53, 4059 Basel, Švajčiarsko
E-mail: swiss.ara@arazygroup.com

Austrálsky zadávateľ: Emergo Australia, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000 Austrália

Zamýšľané použitie/účel

Na purifikáciu genómovej DNA zo súprav na odber slín Oragene™ a ORAcollect™.

Stabilita pri používaní

PT-L2P-5 (5 ml) a PT-L2P-45 (45 ml) majú 30-mesačnú stabilitu počas používania pri izbovej teplote.

Funkcie

- Optimalizovaná chémia na maximálnu obnovu DNA zo vzoriek odobratých z ústnej dutiny pomocou produktových radov Oragene a ORAcollect.
- Preukázalo sa, že poskytuje konzistentné výsledky pri vysokomolekulárnej DNA.
- Škálovateľná metóda čistenia pre veľké alebo malé objemy vzoriek.
- Pohodlný pracovný postup s kompletnou technickou podporou od zberu až po extrakciu.
- Cenovo výhodná metóda, ktorá si vyžaduje minimálne vybavenie.

Materiály

- PT-L2P-5 (5 ml) a/alebo PT-L2P-45 (45 ml)
- Príručka produktu prepIT•L2P

Výstrahy a bezpečnostné opatrenia

- Len na laboratórne použitie.
- Nepoživajte tekutú reagensiu.
- NEPOUŽÍVAJTE, ak je obal poškodený alebo ak je tesnenie vo viečku lievika porušené alebo netesné.
- Produkt prepIT•L2P NEPOUŽÍVAJTE po dátume „Spotrebujte do“ uvedenom na fľaši s reagensiou.
- Ak sa reagensia dostane do kontaktu s očami alebo pokožkou, umyte ju vodou. NEPOŽÍVAJTE.
- Nahláste akýkoľvek závažný incident spoločnosti DNA Genotek a príslušnému orgánu vo vašej krajine.
- Informácie o bezpečnej likvidácii nepoužitej reagensie nájdete v karte bezpečnostných údajov (KBÚ).
- KBÚ je k dispozícii na adrese www.dnagenotek.com.

Obmedzenia používania produktu

Produkt prepIT•L2P používajte len podľa pokynov uvedených v tejto príručke.

Preprava produktu prepIT•L2P

Produkt prepIT•L2P sa môže prepravovať pri teplote okolia ako laboratórna reagensia. Nevyžaduje sa žiadna osobitná manipulácia.

Skladovanie produktu prepIT•L2P (doba skladovania)

Skladujte pri izbovej teplote. Čas skladovania pre produkty PT-L2P-5 (5 ml) a PT-L2P-45 (45 ml) je 30 mesiacov, ak sú správne uzatvorené a skladované pri izbovej teplote.

Likvidácia

Nepoužité, poškodené alebo netesné súpravy zlikvidujte v súlade s príslušnými miestnymi a štátnymi predpismi. Zlikvidujte ako laboratórny odpad.

Údržba/opravy

Neuplatňuje sa. Produkt prepIT•L2P je reagensia – nevyžaduje sa žiadna údržba ani oprava.

Súhrn charakteristických vlastností produktu

Purifikovaná genómová DNA produktu prepIT•L2P zo súprav na odber slín Oragene a ORAcollect poskytuje DNA vysokej kvality a množstva, ktoré je dostatočné na použitie v nadväzujúcich aplikáciách, ako je PCR, mikroanalýza a sekvenovanie novej generácie.

Balenie produktu

Produkt prepIT•L2P je k dispozícii vo viacerých objemoch v závislosti od počtu požadovaných preparátov. Napríklad:

Referenčné/katalógové číslo produktu	Objem na prípravu vzorky	Počet preparátov
PT-L2P-5	0,5 ml	200
PT-L2P-45	0,5 ml	2 000

Záruky

Úplné podmienky pre všetky produkty DNA Genotek nájdete na stránke <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>.

Riešenie problémov

Obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti DNA Genotek na adrese support@dnagenotek.com alebo zavolajte na číslo +1 (613) 723-5757, klapka 6.

Laboratórny protokol k produktu prepIT™ - L2P na manuálnu purifikáciu DNA z 500 µl vzorky

Nasledujúci protokol podrobne opisuje, ako purifikovať DNA z 500 µl alikvotnej časti vzorky.

Zahrnuté reagensie

prepIT•L2P (kat. č. PT-L2P-5 alebo PT-L2P-45)

Vybavenie a reagensie

- Mikrocentrifúga schopná prevádzky pri 15 000 × g
- 1,5 ml mikroskúmavky (napr. Axygen® kat. č. MCT-150-C)
- Vzduchový alebo vodný inkubátor pri teplote 50 °C
- Etanol (95 % až 100 %) pri izbovej teplote
- Etanol (70 %) pri izbovej teplote
- Tlmivý roztok na uchovávanie DNA: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) alebo podobný roztok

Postup

Kroky čistenia	Poznámky
1. Vzorku Oragene/ORACollect premiešavajte prevrátením alebo jemným pretrepávaním počas niekoľkých sekúnd.	• Tým sa zabezpečí správne premiešanie viskózných vzoriek.

Kroky čistenia	Poznámky
2. Vzorku inkubujte pri teplote 50 °C vo vodnom inkubátore minimálne 1 hodinu alebo vo vzdušnom inkubátore minimálne 2 hodiny.	<ul style="list-style-type: none"> Tento krok tepelnej úpravy je nevyhnutný na zabezpečenie primeraného uvoľnenia DNA a trvalej inaktivácie nukleáz. Tento inkubačný krok sa môže vykonať kedykoľvek po odbere vzorky a pred jej prečistením. Celá vzorka sa musí pred alikvotáciou inkubovať v pôvodnej odberovej skúmavke, aby sa zabezpečila homogenita vzorky. Vzorka sa môže inkubovať pri teplote 50 °C cez noc, ak je to vhodnejšie. Vo vzduchovom inkubátore je potrebný dlhší čas, pretože vyrovnávanie teploty je pomalšie ako vo vodnom inkubátore. <p>Poznámka: Použitie vzduchového inkubátora môže byť vhodnejšie, pretože skúmavky Oragene/ORACollect môžu vo vodnom kúpeli plávať. Ak sa musí použiť vodný kúpeľ, zabezpečte, aby časť skúmavky obsahujúca vzorku zostala ponorená vo vode.</p>
3. Preneste 500 µl zmiešanej vzorky do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky.	<ul style="list-style-type: none"> Zvyšok vzorky sa môže skladovať pri izbovej teplote (15 °C až 25 °C) alebo sa môže zmraziť. V prípade potreby sa vzorka môže skladovať zmrazená v skúmavke Oragene/ORACollect pri teplote –20 °C alebo sa môže preniesť do kryoliekovky na dlhodobé skladovanie pri teplote –80 °C.
4. Do mikrocentrifugačnej skúmavky pridajte 20 µl (1/25 objemu) produktu prepIT•L2P a premiešajte niekoľkokondovým vortexovaním.	<ul style="list-style-type: none"> Vzorka sa zakalí, pretože sa z nej vyzrážajú nečistoty a inhibítory.
5. Inkubujte na ľade 10 minút.	<ul style="list-style-type: none"> Inkubáciu pri izbovej teplote možno nahradiť, ale bude o niečo menej účinná pri odstraňovaní nečistôt.

Kroky čistenia	Poznámky
6. Odstreďte pri izbovej teplote 5 minút rýchlosťou 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> Dlhšia doba odstreďovania (do 15 minút) môže byť prospešná pre zničenie zákalu (vysoká A₃₂₀) konečného roztoku DNA.
7. Opatrne preneste číry supernatant pomocou špičky pipety do čerstvej mikrocentrifugačnej skúmavky. Pelety obsahujúce nečistoty zlikvidujte.	<ul style="list-style-type: none"> Pelety obsahujú zakalené nečistoty. Ak sa náhodne narušia, skúmavka by sa mala znovu odstrediť.
8. Pridajte 600 µl 95 % až 100 % etanolu izbovej teploty. Jemne premiešajte 10-krát prevrátením.	<ul style="list-style-type: none"> Počas miešania s etanolom sa DNA vyzráža. Tá sa môže prejavíť ako zrazenina vlákien DNA alebo ako jemný precipitát v závislosti od množstva DNA vo vzorke. Aj keď sa nezistí žiadna zrazenina, DNA sa získa opatrným dodržiavaním ďalších krokov.
9. Vzorku nechajte stáť pri izbovej teplote 10 minút, aby sa DNA úplne precipitovala.	<ul style="list-style-type: none"> Inkubácia pri teplote –20 °C sa neodporúča, pretože spolu s DNA sa môžu vyzrážať nečistoty.
10. Umiestnite skúmavku do mikrocentrifúgy v známej orientácii. Odstreďte pri izbovej teplote 2 minúty rýchlosťou 15 000 × g.	<ul style="list-style-type: none"> Napríklad každú skúmavku umiestnite do mikrocentrifúgy tak, aby zavesná časť uzáveru smerovala od stredu rotora. Po odstredení je možné lokalizovať polohu pelety (aj keď je príliš malá na to, aby bola viditeľná); bude sa nachádzať na konci skúmavky pod závesom.
11. Opatrne odstráňte supernatant pomocou špičky pipety a zlikvidujte ho. Dávajte pozor, aby ste nenarušili pelety DNA.	<ul style="list-style-type: none"> Táto peleta obsahuje DNA. Strata pelety bude mať za následok stratu DNA. Otočenie skúmavky tak, aby sa peleta nachádzala na hornej stene, vám umožní bezpečne pohybovať špičkou pipety po spodnej stene a odstrániť všetok supernatant. Supernatant môže obsahovať nečistoty a mal by sa čo najúplnejšie odstrániť.

Kroky čistenia	Poznámky
12. Umývanie etanolom: Opatrne pridajte 250 µl 70 % etanolu. Nechajte ho odstáť pri izbovej teplote 1 minútu. Úplne odstráňte etanol bez toho, aby ste narušili pelety.	<ul style="list-style-type: none"> • Je dôležité odstrániť zo vzorky všetok etanol. Prenos etanolu môže ovplyvniť výkonnosť testu. • Po odstránení 70 % etanolu sa skúmavka môže pulzne roztočiť, aby sa odstránil zvyšný etanol. • Dávajte pozor, aby ste nenašili pelety DNA. Môžu byť malé alebo neviditeľné. • Ak sa peleta oddelí, odstredíte vzorku 5 minút rýchlosťou 15 000 × g. • Nadmerné vysušenie pelety môže sťažiť rozpustenie DNA.
13. Pridajte 100 µl roztoku TE (pozrite si stranu 5) na rozpustenie pelety DNA. Vortexujte najmenej 5 sekúnd.	<ul style="list-style-type: none"> • Ak je požadovaná vyššia koncentrácia DNA, malo by sa použiť 50 µl roztoku TE.
14. Aby sa zabezpečila úplná rehydrácia DNA, inkubujte pri izbovej teplote cez noc s následným vírením alebo pri 50 °C počas 1 hodiny s občasným vírením.	<ul style="list-style-type: none"> • Veľké množstvá vysokomolekulárnej DNA sa môžu pomaly úplne rehydratovať (rozpustiť). • Neúplná rehydrácia DNA je príčinou nepresnosti pri odhade koncentrácie DNA a možného zlyhania následných aplikácií, ako je PCR.
15. Možnosti skladovania úplne rehydratovanej DNA: a) V roztoku TE pri teplote 20 °C na dlhodobé skladovanie. V prípade potreby rozdeľte na alikvotné časti. b) V TE pri teplote 4 °C až 2 mesiace.	

Laboratórny protokol k produktu prepIT•L2P

na manuálnu purifikáciu DNA z celej vzorky

Poznámka: Tento protokol si na dosiahnutie optimálnych výsledkov vyžaduje použitie centrifúgy (buď s pevným uhlom, alebo výkyvným rotorom), ktorá dokáže generovať najmenej 3 500 × g.

Nasledujúci protokol podrobne opisuje spôsob purifikácie DNA z celej vzorky (1 ml – 4 ml celkového objemu vzorky). Uvedené objemy by sa mali upraviť podľa skutočne odobratého objemu.

Zahrnuté reagensie

prepIT•L2P (kat. č. PT-L2P-5 alebo PT-L2P-45)

Vybavenie a reagensie

- Odstredivka, ktorá pojme 15 ml skúmavky a je schopná vygenerovať najmenej 3 500 × g (pozrite si tabuľku č. 2)
- 15 ml kónické polypropylénové skúmavky (napr. BD Falcon® kat. č. 352196)
- Mikrocentrifúga schopná prevádzky pri 15 000 × g (voliteľné)
- 1,5 ml mikroskúmavky (napr. Axygen® kat. č. MCT-150-C)
- Vzduchový alebo vodný inkubátor pri teplote 50 °C
- Etanol (95 % až 100 %) pri izbovej teplote
- Etanol (70 %) pri izbovej teplote
- Tlmivý roztok na uchovávanie DNA: TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) alebo podobný roztok

Voliteľná možnosť: Kontrola pred čistením (platí len pre vzorky Oragene; nevyžaduje sa pre vzorky ORAcollect)

Odvážte vzorku, aby ste odhadli množstvo slín, ktoré poskytol darca (pozrite sa tabuľku č. 1). Množstvo odobratých slín je priamo úmerné množstvu získanej DNA. Ak napríklad darca poskytol menej ako 2 ml slín, mali by ste očakávať, že z tejto vzorky získate nižší celkový výťažok.

Hmotnosť súpravy (bez vzorky)

Po doručení vzorky do laboratória odporúčame vzorku odvážiť, aby sa odhadlo, či darca poskytol správne množstvo slín. Môžete očakávať určitú variabilitu medzi darcami. Uvádza sa priemerná hmotnosť prázdnej súpravy (tabuľka č. 1). Na odhad množstva odobratej vzorky (za predpokladu 1 g/ml) vykonajte nasledujúci výpočet:


$$\frac{\text{Hmotnosť súpravy obsahujúcej vzorku} - \text{hmotnosť súpravy bez vzorky}}{\text{Množstvo odobratej vzorky}}$$


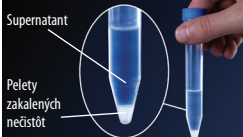
Množstvo odobratej vzorky

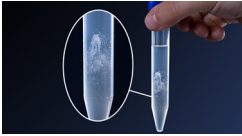

Tabuľka č. 1

Č. produktu	Hmotnosť súpravy bez vzorky
OG-500/OGD-500/OGR-500	6,81 g
OG-510/OGD-510	5,83 g
OG-575/OGD-575/OGR-575	5,66 g
ON-500	6,47 g
ON-600	6,86 g
OG-600/OGD-600/OGR-600	7,26 g
OG-610/OGD-610	6,28 g
OG-675/OGD-675/OGR-675	6,00 g

Postup

Kroky čistenia	Poznámky
1. Vzorku Oragene/ORACollect premiešavajte prevrátením alebo jemným pretrepávaním počas niekoľkých sekúnd.	<ul style="list-style-type: none">• Tým sa zabezpečí správne premiešanie viskózných vzoriek.
2. Vzorku inkubujte pri teplote 50 °C vo vodnom inkubátore minimálne 1 hodinu alebo vo vzdušnom inkubátore minimálne 2 hodiny.	<ul style="list-style-type: none">• Tento krok tepelnej úpravy je nevyhnutný na maximalizáciu výťažku DNA a zabezpečenie trvalej inaktivácie nukleáz.• Ak je to vhodnejšie, vzorka sa môže inkubovať pri teplote 50 °C cez noc.• Tento inkubačný krok sa môže vykonať kedykoľvek po odbere vzorky a pred purifikáciou DNA.• Vo vzdušnom inkubátore je potrebný dlhší čas, pretože vyrovnávanie teploty je pomalšie ako vo vodnom inkubátore. <p>Poznámka: Použitie vzduchového inkubátora môže byť vhodnejšie, pretože skúmavky Oragene/ORACollect môžu vo vodnom kúpeli plávať. Ak sa musí použiť vodný kúpeľ, zabezpečte, aby časť skúmavky obsahujúca vzorku zostala ponorená vo vode.</p>
3. Celú vzorku preneste do 15 ml centrifugačnej skúmavky (obrázok č. 1). Zaznamenajte objem vzorky.	<ul style="list-style-type: none">• Prenos sa môže uskutočniť buď naliatím, alebo pipetovaním sklenenou alebo plastovou pipetou.  <p>Obrázok č. 1: Pred prechodom ku kroku 4 sa uistite, že celá vzorka bola inkubovaná a prenesená do novej 15 ml centrifugačnej skúmavky, ako je znázornené na obrázku.</p>

Kroky čistenia	Poznámky
<p>4. Pridajte 1/25 objemu produktu prepIT-L2P a premiešajte vortexovaním počas niekoľkých sekúnd (obrázok č. 2).</p>  <p>Obrázok č. 2: Po pridaní PT-L2P a 10 minútach inkubácie na ľade už vzorka nebude číra, ale bude mať skôr zakalenú farbu.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Napr. k 4 ml vzorky pridajte 160 µl produktu prepIT-L2P. Vzorka sa zakalí, pretože sa z nej precipitujú nečistoty a inhibitory.
<p>5. Inkubujte na ľade 10 minút.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Inkubácia pri izbovej teplote môže byť nahradená, ale bude menej účinná pri odstraňovaní nečistôt.
<p>6. Odstredujte pri izbovej teplote 10 minút čo najvyššou rýchlosťou. Minimálne 3 500 x g.</p>  <p>Obrázok č. 3: Po odstredení sa na dne skúmavky nahromadí zakalený materiál. Supernatant by mal byť viditeľne číry.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Vyššia odstredivá sila minimalizuje množstvo zakaleného materiálu, ktorý sa preniesie do purifikovanej DNA (obrázok č. 3). Pred pokračovaním by ste si mali u výrobcu skúmaviek overiť, či 15 ml skúmavky na odstredovanie vydržia danú odstredivú silu. Dlhšia doba odstredovania (do 20 minút) môže byť prospešná pre zníženie zákalu (vysoká A₃₂₀) konečného roztoku DNA.
<p>7. Číry supernatant opatrne preneste pipetou do novej 15 ml centrifugačnej skúmavky. Pelety zlikvidujte.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Ponechajte malý objem supernatantu, aby ste nenarušili pelety. Pelety obsahujú zakalené nečistoty. Ak sa náhodne narušia, skúmavka by sa mala znovu odstrediť.

Kroky čistenia	Poznámky
<p>8. K číremu supernatantu pridajte 1,2-násobný objem 95 % až 100 % etanolu izbovej teploty. Jemne premiešajte 10-krát prevrátením.</p>  <p>Obrázok č. 4: Po pridaní etanolu sa DNA precipituje, čo môže mať za následok viditeľnú zrazeninu vlákien.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Počas miešania s etanolom sa DNA precipituje. Precipitovaná DNA sa môže javiť ako zrazenina vlákien DNA (obrázok č. 4) alebo ako jemná zrazenina v závislosti od množstva DNA vo vzorke.
<p>9. Nechajte vzorku stáť pri izbovej teplote 10 minút, aby sa DNA úplne vyzrážala.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Inkubácia pri teplote -20 °C sa neodporúča, pretože spolu s DNA sa môžu vyzrážať nečistoty.
<p>10. Odstredujte pri izbovej teplote 10 minút čo najvyššou rýchlosťou. Minimálne 3 500 x g.</p>	
<p>11. Opatrne odstráňte supernatant sklenenou alebo plastovou pipetou a zlikvidujte ho. Dávajte pozor, aby ste nenarušili pelety DNA.</p>  <p>Obrázok č. 5: Použitím špičky pipety na jemné poškrabanie po vnútornej strane skúmavky môžete odhaliť prítomnosť nánosu DNA.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Supernatant môže obsahovať nečistoty a mal by sa čo najúplnejšie odstrániť. Precipitovaná DNA sa bude nachádzať ako peleta na dne skúmavky a prípadne ako škrvrna na boku skúmavky (obrázok č. 5). Nános DNA môže byť umiestnený na strane skúmavky odvrátenej od stredu centrifúgy. Nános je možné lokalizovať pomocou „scratch“ testu. Prítomnosť nánosu DNA môžete skontrolovať oškrabaním vnútornej strany skúmavky pomocou špičky pipety. Môže byť viditeľná škrvrna, ako je znázornené na obrázku č. 5.

Kroky čistenia	Poznámky
<p>12. Umyvanie etanolom: Do skúmavky opatrne pridajte 1 ml 70 % etanolu bez toho, aby ste narušili nános alebo pelety. Nechajte ho odstáť pri izbovej teplote 1 minútu. Jemne premiešajte a úplne odstráňte etanol bez toho, aby ste narušili pelety a nános.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Je dôležité odstrániť zo vzorky všetok etanol. Prenos etanolu môže ovplyvniť výkonnosť testu. • Dbajte na to, aby ste nenasušili pelety DNA alebo náter. • Na ulahčenie úplného odstránenia supernatantu sa môže vykonať krátko odstredenie (menej ako 1 minúta). • Ak sa peleta po etanolovom premytí oddelí, odstredíte vzorku 5 minút čo najvyššou rýchlosťou. Minimálne 3 500 × g.
<p>13. V prípade vzoriek Oragene rehydratujte DNA pridaním 0,2 ml – 1 ml roztoku TE a 30 sekúnd vzorku vortexujete.</p> <p>V prípade vzoriek ORAcollect rehydratujte DNA pridaním 0,2 ml roztoku TE a vzorku 30 sekúnd vortexujete.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ak je požadovaná vyššia koncentrácia DNA, objem TE sa môže znížiť. Malo by sa použiť minimálne 200 µl roztoku TE. • Nadmerné vysušenie pelety (> 10 minút) a použitie menej ako 500 µl roztoku TE môže sťažiť rehydratáciu (rozpustenie) DNA a môže znížiť výťažok alebo sťažiť kvantifikáciu. • Precipitovaná DNA sa bude nachádzať ako peletka na dne skúmavky a prípadne ako škrvrna na boku skúmavky. • Aby sa zabezpečila maximálna výťažnosť DNA, musí sa vzorka po pridaní rozpúšťadla DNA (roztok TE) vortexovať. Vortexovanie zabezpečí, aby sa DNA nanosená na boku skúmavky zachytila (obrázok č. 6). • Vortexovaním sa DNA nefragmentuje.
 <p>Obrázok č. 6: Vortexovanie vzorky počas 30 sekúnd vám umožní obnoviť DNA nanosenú na boku skúmavky. DNA zostane vysokomolekulárna.</p>	
<p>14. Aby sa zabezpečila úplná rehydratácia DNA, inkubujte pri izbovej teplote cez noc s následným vortexovaním alebo pri teplote 50 °C počas 1 hodiny s občasným vortexovaním.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Neúplná rehydratácia DNA je príčinou nepresnosti pri odhade koncentrácie DNA a možného zlyhania následných aplikácií, ako je PCR.

Kroky čistenia	Poznámky
<p>15. Rehydratovanú DNA preneste do 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky na uskladnenie.</p>	
<p>Voliteľný krok:</p> <ol style="list-style-type: none"> Rehydratovanú DNA odstredíte pri izbovej teplote 15 minút rýchlosťou 15 000 × g. Preneste supernatant do čerstvej 1,5 ml mikrocentrifugačnej skúmavky bez toho, aby ste narušili peletu. 	<p>Všimnite si, že peleta obsahuje nerozpustný, zakalený materiál.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aby ste maximalizovali výťažnosť DNA, pred týmto krokom centrifugácie zabezpečte, aby bola DNA úplne rehydratovaná (krok 14). • Tento krok odstredovania zabezpečí, že sa zo vzorky DNA odstráni všetok zostávajúci zakalený materiál. • Pri prenášaní číreho supernatantu do novej skúmavky je potrebné dbať na to, aby sa peleta nenasušila.
<p>16. Možnosti skladovania úplne rehydratovanej DNA:</p> <ol style="list-style-type: none"> V roztoku TE pri teplote 20 °C na dlhodobé skladovanie. V prípade potreby rozdelte na alikvotné časti. V roztoku TE pri teplote 4 °C až 2 mesiace. 	<ul style="list-style-type: none"> • Zmrazenie purifikovanej DNA v TE môže spôsobiť precipitáciu DNA. Pri rozmrazovaní zmrazenej purifikovanej DNA dbajte na rehydratáciu, ako je uvedené v kroku 14.

Kvantifikácia DNA

Fluorescenčnou metódou

Testy, ktoré používajú fluorescenčné farbivá, sú špecifickejšie ako absorbančia pri vlnovej dĺžke 260 nm na kvantifikáciu množstva dvojláčkovej DNA (dsDNA) vo vzorke DNA. Odporúčame použiť komerčne dostupné súpravy, ako je Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) alebo QuantiFluor™ dsDNA System (Promega). Pred použitím v kvantifikačnom teste môže byť potrebné zriediť DNA s roztokom TE v pomere 1 : 50.

Absorpčnou metódou

Ak sa rozhodnete kvantifikovať DNA pomocou absorbancie, odporúčame vám, aby ste prečistenú vzorku najprv ošetrili RNázou, aby sa rozštiepila kontaminujúca RNA, a potom odstránili fragmenty RNA precipitáciou DNA etanolom. Podrobný protokol je opísaný v dokumente PD-PR-040, *Odstránenie RNA dvojitým rozkladom RNázou*.¹ Upozorňujeme, že DNA z orálnej vzorky zvyčajne obsahuje výrazne viac RNA ako vo vzorkách krvi. Pred odčítaním absorbancie sa uistite, že je alkoholom precipitovaná DNA úplne rozpustená.

Konverzný faktor: Absorbančia 1,0 pri vlnovej dĺžke 260 nm zodpovedá koncentrácii 50 ng/μl (50 μg/ml) pre čistú dvojláčkovú DNA.

Uistite sa, že hodnoty absorbancie sú v lineárnom rozsahu spektrofotometra. Zriedte a znovu zmerajte vzorky, ktoré sa nachádzajú mimo lineárneho rozsahu. Ďalšie informácie si prečítajte v dokumentácii nástroja.

Referencie

- ¹ Odstránenie RNA dvojitým rozkladom RNázou. PD-PR-040. DNA Genotek.

Metóda

- Zriedte 10 μl alikvótnu časť purifikovanej DNA upravenej RNázou s 90 μl roztoku TE (riedenie 1 : 10). Premiešajte jemným pipetovaním hore a dole. Počkajte, kým sa bublinky vyčistia.
- V referenčnej (prázdnej) bunke použite roztok TE.
- Merajte absorbanciu pri 320 nm, 280 nm a 00260 .
- Vypočítajte korigované hodnoty A_{280} a A_{260} odpočítaním absorbancie pri vlnovej dĺžke 320 nm (A_{320}) od hodnôt A_{280} a A_{260} .
- Koncentrácia DNA v ng/μl = korigovaná $A_{260} \times 10$ (faktor riedenia) $\times 50$ (konverzný faktor).
- Pomer A_{260}/A_{280} : Korigovanú hodnotu A_{260} vydajte korigovanou hodnotou A_{280} .











Príklad

- Predpokladajme, že namerané hodnoty $A_{320} = 0,025$, $A_{280} = 0,175$ a $A_{260} = 0,295$
- Koncentrácia DNA v neriedenej vzorke bude:
$$(A_{260} - A_{320}) \times 10 \text{ [faktor riedenia]} \times 50 \text{ [konverzný faktor]}$$
$$= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$$
$$= 0,270 \times 10 \times 50$$
$$= 135 \text{ ng/}\mu\text{l alebo } 135 \text{ }\mu\text{g/ml}$$
- Korigovaný pomer A_{260}/A_{280} bude:
$$(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$$
$$= (0,295 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$$
$$= 0,270 \div 0,150$$
$$= 1,80$$

Oragene•DNA a ORACollect•DNA nie sú k dispozícii na predaj v Spojených štátoch amerických. Pomôcka Oragene•DISCOVER je určená len na výskumné účely, nie na použitie pri diagnostických postupoch.

Niektoré produkty DNA Genotek nemusia byť dostupné vo všetkých geografických oblastiach. Oragene, prepIT, ORACollect a DNA Genotek sú ochranné známky spoločnosti DNA Genotek Inc. Všetky ostatné značky a názvy, ktoré sú tu uvedené, sú vlastníctvom ich príslušných vlastníkov. Všetky protokoly DNA Genotek, biele knihy a aplikačné poznámky sú k dispozícii v časti podpory na našej webovej stránke www.dnagenotek.com.

Legenda k označeniu:

	In vitro diagnostická zdravotnícka pomôcka
	Katalógové číslo
	Označenie CE
	Výrobca
	Pozrite si príbalový leták
	Splnomocnený zástupca pre Európu
	Splnomocnený zástupca pre Švajčiarsko
	Číslo šarže
	Jedinečný Identifikátor pomôcky
	Stabilita pri používaní
15 °C / 30 °C	Pokyny na skladovanie
59 °F / 86 °F	

Patent (www.dnagenotek.com/legalnotices)

PD-HB-45 (SK - Slovak) Issue 1/2024-01

© 2024 DNA Genotek Inc., dcérska spoločnosť OraSure Technologies, Inc., všetky práva vyhradené.

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com